

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-233798

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)9月29日

C 12 P 19/32

Z-7236-4B

C 12 N 15/00

A-8412-4B

// (C 12 P 19/32

C 12 R 1:19)

審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑭ 発明の名称 5'-グアニル酸の製造法

⑮ 特 願 昭61-281589

⑯ 出 願 昭61(1986)11月26日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)10月9日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭61-240558

⑳ 発 明 者 藤 尾 達 郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1
 ㉑ 発 明 者 丸 山 明 彦 神奈川県川崎市多摩区登戸3150
 ㉒ 発 明 者 西 達 也 東京都町田市中町3-9-11
 ㉓ 発 明 者 伊 藤 蓓 菫 神奈川県相模原市相原字八幡西218-14
 ㉔ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

5'-グアニル酸の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP、プロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を培地で培養し、得られた培養液、菌体またはそれらの処理物を酵素源とし、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸、およびアンモニアまたはグルタミンを基質として反応を行い、反応液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該反応液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

(2) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP、プロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベ

クターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸およびアンモニアまたはグルタミンを含む培地で培養し、培養液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該培養液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子の組換えDNA手法により5'-グアニル酸(以下GMPと称す)を製造する方法に関する。さらに詳細には、本発明は5'-キサンチル酸(以下XMPと称す)、アデノシン-三リン酸(以下ATPと称す)およびアンモニアまたはグルタミンからGMPを合成するグアニル酸合成酵素(別名:キサンチル酸アミナーゼ、以下GMPシンセターゼと称す)の遺伝子を含むDNA断片とベクターDNA断片との組換え体DNAを用い、微生物を形質転換

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-233798

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)9月29日

C 12 P 19/32

Z-7236-4B

C 12 N 15/00

A-8412-4B

//(C 12 P 19/32

C 12 R 1:19)

審査請求 未請求 発明の数 2 (全9頁)

⑬ 発明の名称 5'-グアニル酸の製造法

⑭ 特 願 昭61-281589

⑮ 出 願 昭61(1986)11月26日

優先権主張 ⑯ 昭61(1986)10月9日 ⑰ 日本(JP) ⑱ 特願 昭61-240558

⑲ 発 明 者 藤 尾 達 郎 神奈川県相模原市相模台6-29-1

⑲ 発 明 者 丸 山 明 彦 神奈川県川崎市多摩区登戸3150

⑲ 発 明 者 西 達 也 東京都町田市中町3-9-11

⑲ 発 明 者 伊 藤 菁 菫 神奈川県相模原市相原字八幡西218-14

⑳ 出 願 人 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明 細 書

1. 発明の名称

5'-グアニル酸の製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP_Lプロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベクターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を培地で培養し、得られた培養液、固体またはそれらの処理物を酵素源とし、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸、およびアンモニアまたはグルタミンを基質として反応を行い、反応液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該反応液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

(2) グアニル酸合成酵素遺伝子上流にP_Lプロモーター遺伝子を保持するDNA断片とベ

クターDNAとの組換え体DNAを用いて、温度感受性のcIリプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換して得られる形質転換株を、5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸およびアンモニアまたはグルタミンを含む培地で培養し、培養液中に5'-グアニル酸を蓄積せしめ、該培養液から5'-グアニル酸を採取することを特徴とする5'-グアニル酸の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は遺伝子の組換えDNA手法により5'-グアニル酸(以下GMPと称す)を製造する方法に関する。さらに詳細には、本発明は5'-キサンチル酸(以下XMPと称す)、アデノシン-三リン酸(以下ATPと称す)およびアンモニアまたはグルタミンからGMPを合成するグアニル酸合成酵素(別名:キサンチル酸アミナーゼ、以下GMPシンセターゼと称す)の遺伝子を含むDNA断片とベクターDNA断片との組換え体DNAを用い、微生物を形質転換

して得られる形質転換株を培地に培養し、得られた培養液、菌体またはそれらの処理物を酵素源とする反応によるXMPからのGMPの製造法に関する。

GMPには調味料としての大きな用途があり、より安価な工業的製法の開発が望まれている。

GMPの製法としては、リボ核酸を分解する方法、発酵法により前駆物質（グアノシン等）を生産し、合成法によってGMPに変換する方法、微生物により直接発酵生産する方法などが知られている。

本発明者らは、XMPからGMPを製造する方法について検討した結果、先にXMPからGMPを生成する酵素であるGMPシンセターゼの遺伝子（以下guaAと称することもある）をプラスミドベクターpBR322にクローン化し、さらにguaAの上流に大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター（以下trpプロモーターまたはPtrpと称す）を連結した組換え体プラスミドを造成し、該プラスミド

し、その培養液、培養菌体またはそれらの処理物を酵素源として該酵素反応を行い、もしくは該形質転換株を5'-キサンチル酸、アデノシン-三リン酸、およびアンモニアまたはグルタミンを含む培地で培養し、かくして得られる反応液または培養液からGMPを採取するGMPの製法である。

本発明に用いるGMPシンセターゼ遺伝子を含むDNA断片としては、原核生物、バクテリア、またはプラスミドに由来するものがあげられるが、なかでも大腸菌由来のGMPシンセターゼ遺伝子を含むDNA断片ならびに該DNA断片を保有するプラスミドが好適である。具体的には大腸菌染色体由来のイノシン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子（以下guaBと称することもある）とguaAの両遺伝子を含むDNA断片と、コリシンE₁（以下ColE₁と称す）DNAとのハイブリッドプラスミドであるpLC34-10またはpLC32-25（いずれもMethods in Enzymology 68, 396-408 (1979)

を微生物に形質転換して得られる形質転換株がXMPをGMPに変換する高い活性を有することを見出した（公開特許公報昭60-192597号公報参照）が、さらに検討を進めた結果、Ptrpプロモーター遺伝子の下流にGMPシンセターゼの遺伝子を有するDNA断片を挿入したプラスミドベクターを用いて、温度感受性のcl₁リプレッサー遺伝子（cl₁ss^r）を有する大腸菌を形質転換することにより、XMPをGMPに変換する活性が著しく強化された菌株を取得できることを見出し、本発明を完成するに至った。

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は、XMP、ATPおよびアンモニアまたはグルタミンから酵素反応によりGMPを生成せしめるに際し、ベクターDNAのPtrpプロモーター遺伝子の下流にGMPシンセターゼ遺伝子を含むDNA断片を挿入した組換え体プラスミドDNAを得、これを用いて温度感受性のcl₁リプレッサー遺伝子を保持する大腸菌を形質転換し、得られた形質転換株を培地に培養

記載）がguaAの供給源として好適であり、これらのプラスミドを含有する大腸菌JA200株（Yale大学、E. coli genetic stock center（以下CGSCと称す）から入手、L. Clarke & J. Carbon, Cell 9, 91-99 (1976) 記載）から公知の方法（Nucleic Acids Research 7, 1513 (1979), 以下プラスミドの取得にはこの方法を用いる。）によりプラスミドDNAを分離精製する。

さらに、pL34-10からguaB遺伝子の大部分を取り除き、残るguaA遺伝子を含むDNA断片の上流にトリプトファン・プロモーターを接続し、これとpBR322プラスミドベクターを結合して造成（特開昭60-192597号公報参照）したpXAR66プラスミドも好適である。

大腸菌の染色体上においてguaAはguaBのすぐ下流に位置し、guaA、guaB両遺伝子はguaB上流のプロモーター・オペレーター領域とともに1つのオペロンを形成してい

る(Molec. gen. Genet., 147, 203-208 (1976))。

GMPが菌体内に蓄積すると両遺伝子の発現は抑制される。またg u a Bとg u a Aの間(またはg u a B領域内)に上流のプロモーターより低い転写活性を有する第2のプロモーター(Secondary Promoter)が存在することが知られている(J. Bact., 131, 685-688 (1977))。

本発明に用いるGMPシンセターゼを効率よく発現する組換え体プラスミドの構築に用いるプラスミドとしては、大腸菌中でGMPシンセターゼの遺伝子が発現できるものならどのようなプラスミドでも使うことができる。より好ましくは、抗生物質耐性等の性質を宿主菌に付与する性質を有するものが好ましい。具体例としてpBR322(Gene 2, 95 (1977))、pBR325(Gene 4, 121 (1978))から誘導されたP₁プロモーターを含むpPLD1、pP₁T4、pP₁T20、pPA1、pPLA66プラスミドがあげられる。

遺伝子を含むDNA断片とベクターDNAと

の組換え体の作製は、公知の試管内組換えDNA技法を用いることにより実施できる。試験管内のDNA組換えは、通常、目的の遺伝子を含む供与体DNAとベクターDNAの物理的もしくは酵素的切断と結合(リガーゼ反応)により行われる。リガーゼ反応液中からの目的組換え体の取得は、このDNA混液を用いて直接大腸菌を形質転換し、目的の遺伝子の遺伝情報に由来する遺伝形質が付与された形質転換株を選択分離し、その培養菌体から抽出分離することにより達成できる。pBR322等の薬剤耐性を宿主株に付与するベクターを用いる場合は、形質転換後まず薬剤耐性株を選択し、しかる後に目的の遺伝子の遺伝情報に由来する遺伝形質が付与された形質転換株を分離する方法によっても目的の組換え体を得ることができる。

本発明の宿主微生物としては、λファージのc1リプレッサーが温度感受性となった変異遺伝子(例えばc1₁₈₁)を保持している大腸菌であればいずれでも使用できるが、具体的

にはエシェリヒア・コリMP347(FERM BP-408)、エシェリヒア・コリNr69(以下エシェリヒア・コリをE.coliと略記する)などを例示することが出来る。

宿主微生物の組換え体DNAによる形質転換は公知の方法[Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 69, 2110 (1972), 以下E.coliの形質転換はこの方法による。]により行うことができる。

宿主としてアンピシリンに感受性であるE.coli MP347株を用いる場合、形質転換の結果アンピシリン耐性となった株を選択し、その中からグアニル酸シンセターゼ活性が強化されている菌株を選ぶことにより、組換え体プラスミドの保有しているg u a Aが宿主細胞中で発現する組換え体を選択することが出来る。

かくして得られた形質転換株を通常のE.coliの培養方法によって培養することによって、XMP、ATPおよびアンモニアまたはグルタミンからGMPを生成する強力な酵素活性を有

する培養液もしくは菌体またはそれらの処理物を得ることができる。すなわち、該形質転換株を炭素源、窒素源、無機物、アミノ酸、ビタミン等を含有する通常の培地中において、好気的条件下にて温度、pHなどを調節しつつ培養を行えばよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュクロース、マルトース、マンニトール、ソルビトールなどの炭水化物、糖アルコール、グリセロール、澱粉加水分解液、糖蜜などが使用でき、またビルビン酸、乳酸、クエン酸などの各種有機酸、さらにはグルタミン酸、メチオニンなどの各種アミノ酸も用いる。

窒素源としては、アンモニアあるいは塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、グルタミン酸、グルタミン、メチオニンなどのアミノ酸、あるいはペプトン、N₂-アミン、コーン・ステープ・リカー、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解

解物、フィッシュ・ミールあるいはその消化物、加水分解物などの含窒素有機物などの種々のものが使用可能である。

さらに無機物としては、磷酸二水素カリウム、磷酸一水素ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化鉄、硫酸銅、塩化マンガン、モリブデン酸アンモン、硫酸亜鉛などを必要に応じて添加する。微生物の生育に必要なビタミン、アミノ酸源などは前記したような他の培地成分に伴って培地に供給されれば特に加えなくてもよい。

培養は、振盪培養あるいは通気攪拌培養などの好氣的条件下に行う。培養温度は20～50℃で、好ましくは30～45℃がよい。とりわけGMPシンセターゼ活性の高発現のためには培養の最初もしくは途中から37℃でないし45℃に保つことが有効である。培養中の培地のpHは中性付近に維持することが望ましい。培養時間は通常1～24時間である。

かくして得られる微生物の培養物を、そのま

ができる。この際、pHを6～10に調節することが望ましい。培地中および反応液中の各基質および添加物濃度(g/l)は：XMP 1～100；ATP 1～100；MgSO₄・7H₂O 1～50；(NH₄)₂SO₄・7H₂O 1～25；グルタミン 1～25である。

XMP源としては、高度精製標品のほか、微生物によるXMP発酵液をそのまま、またはその濃縮物、さらにはその部分精製標品など、GMP蓄積を妨げない限りXMPを含有するものであればいずれでも用いる。

ATP源としては、高度精製標品のほか、アデニンをエネルギー供与体存在下に微生物菌体と接触せしめることにより得られるATP含有液(特開昭59-51799)またはその菌体除去液、さらにはそれらの濃縮液などを用いることもできる。

界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・ステアリルアミン(例えばナイミーンS-215、日本油脂社製)、セチルトリメチルアンモニウ

ま、または該培養物を種々処理して得られる処理物を用いて、これとXMP、ATP、およびアンモニアまたはグルタミンとを接触させる。処理物としては、培養物の濃縮物もしくは乾燥物、培養物を遠心分離機で処理して得られる濾液もしくは固体、固体の乾燥物、アセトン処理物、界面活性剤処理物、有機溶剤処理物、溶菌酵素処理物、固定化菌体あるいは菌体からの抽出酵素標品などがあげられる。

接触反応は水性媒体中であればいずれでも行うことができ、最も好適には微生物の培養液中にXMP、ATP、およびアンモニアまたはグルタミンさらに必要に応じて界面活性剤および/または有機溶剤を存在せしめて培養液中にGMPを蓄積せしめるか、培養終了後に培養液、固体、もしくはそれらの処理物にXMP、ATPおよびアンモニアまたはグルタミンを加え、さらに必要に応じて界面活性剤および/または有機溶剤を加え、20～50℃にて1～48時間反応させることによりGMPを蓄積させること

ム・ブロマイド等のカチオン性界面活性剤、ナトリウムオレイルアミド硫酸等のアニオン系界面活性剤、ポリオキシエチレンソルビタン・モノステアレート(例えばノニオンST221、日本油脂社製)等の非イオン性界面活性剤、ラウリルベタイン(例えばアノンBF、日本油脂社製)等の両性界面活性剤等が用いられ、または通常0.1～50g/l、好ましくは1～20g/lの濃度にて用いられる。

有機溶剤としては、トルエン、キシレン、脂肪族アルコール、ベンゼン、酢酸エチルなどが用いられ、その濃度は0.1～50ml/l、好ましくは1～20ml/lがよい。

水性反応液中に蓄積したGMPを採取する方法としては、活性炭やイオン交換樹脂等を用いる通常の方法を用いることができる。

以下に本発明の実施例を示す。

実施例1.

GMPシンセターゼを効率よく発現する組換え体プラスミドの造成

1) P_L-ATCベクターの造成

P_L-プロモーターとトリプトファン・プロモーターのつながったプロモーター部位を有するpP_LT4プラスミド・ベクター(公開特許公報昭60-126086号公報参照)保持株である*E. coli* [P_LT4株(FERM BP406)]をバクトトリプトン(ディフコ社製)10g/ℓ、酵母エキス(ディフコ社製)5g/ℓ、NaCl 5g/ℓを含み、pHを7.2に調整したL培地に植菌し、30℃で18時間培養した。得られた培養菌体から前述の公知の方法に従いプラスミドpP_LT4を分離精製した。なお、以下特記しない限り、菌の培養および保存にはL培地を用いた。

上記で調製したpP_LT4プラスミドDNA約5μgを10mM トリス・塩酸(pH

7.5)、100mM NaCl、7mM

MgCl₂、および6mM 2-メルカプトエタノールを含む緩衝液(以下“Y-100緩衝液”と略称する。なお、他の成分の濃度は同じでNaClの濃度が50mM、0mMのときそれぞれ“Y-50緩衝液”、“Y-0緩衝液”と称する)50μℓに溶かし、20単位の制限酵素Bgl II〔宝酒造社製、以下特記しない限り制限酵素は全て宝酒造社製を用いた〕を加え、37℃で2時間消化反応を行った。このBgl II消化反応液30μℓに5倍濃度のBa₂31緩衝液〔100mM トリス・塩酸(pH8.1)、60mM MgCl₂、60mM CaCl₂、3M NaClを含む〕20μℓ、蒸留水48μℓ、および1単位のBa₂31(Bethesda Research Laboratories社製)を加え、30℃にて10秒間消化反応を行った。反応液に100μℓのフェノール：クロロホルム(容量比1:1)混合液を入れ十分攪拌することにより反応を停止させた。

遠心分離後上層を採取し、2倍量の氷冷エタノールを加え、-80℃にて30分間静置した。このエタノール混合物を遠心分離後上層を捨て、沈殿をT4DNAリガーゼ緩衝液〔20mM トリス・塩酸(pH7.6)、10mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、0.5mM ATPを含む〕40μℓに溶解し、2単位のT4リガーゼを加え、4℃にて18時間処理した。この様にして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて*E. coli* MP347株をCohenらの方法(前述)により形質転換し、アンピシリン(50μg/ml)耐性の形質転換株を得た。

この形質転換株からプラスミドを分離精製し、Xho I、Bgl II等の制限酵素で消化することにより、プラスミドの構造解析を行った結果、P_L-プロモーターの上流にあるXho I部位およびBgl II部位が失われていることを確認し、このプラスミドをpP_LT20と名付けた。

次に、pP_LT20 DNA約5μgをY-100緩衝液50μℓに溶かし、20単位のXho Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。このXho I消化反応液30μℓに5倍濃度のBa₂31緩衝液20μℓ、蒸留水48μℓおよび1単位のBa₂31を加え、30℃にて3分間消化反応を行った。フェノール：クロロホルム抽出、エタノール沈殿ののち、得られた沈殿を20μℓのT4DNAリガーゼ緩衝液中において、2単位のT4DNAリガーゼにより4℃で18時間結合反応を行った。

この様にして得られた組換え体プラスミドDNAを用いて*E. coli* MP347株を形質転換し、アンピシリン耐性株を得た。この中から、テトラサイクリン(20μg/ml)耐性株を選択し、プラスミドDNAを分離し、P_L-プロモーターを含むEcoRI-Hind III断片の塩基配列をマキサム・ギルバート法〔Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560 (1977) 参照〕により決定した。その結果、EcoR

1-Hind III断片は220Kbの大きさで、トリプトファン・プロモーター部分のみが消化されて、P_L-プロモーターのみを有することを確認し、このプラスミドをpPLD1と名付けた(第1図参照)。

トリプトファン・プロモーターの下流に開始コドンATGを持つpTrS10(造成法は参考例1参照)DNA約3μgをY-50緩衝液50μlに溶かし、15単位のC_{la}Iを加え、37℃で2時間の消化反応を行った。次にこの反応液に、0.5μlの5M NaClおよび15単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。この消化物を、低融点アガロースゲル電気泳動法[Analytical Biochemistry 98, 305 (1979)参照](以下DNA断片の精製にはこの方法を用いた)により、ATG部分を含む3.05KbのDNA断片を精製した。一方、pPLD1 DNA約3μgを同様の手順でC_{la}IおよびPst Iで消化後、0.97KbのP_L-プロモーター

37℃で2時間消化反応を行った。続いて、フェノール:クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、DNA断片を全量50μlのDNAポリメラーゼI緩衝液[50mM トリス・塩酸(pH7.6)、7mM MgCl₂、6mM 2-メルカプトエタノール、0.25mM dATP、0.25mM dCTP、0.25mM dGTP、0.25mM dTTPを含む]に溶かし、8単位の大腸菌DNAポリメラーゼI・Klenow断片(Bethesda Research Laboratories社製)を加え、15℃で2時間反応させ、Sph I消化によって生じた3'-突出末端を平滑末端に変えた。反応をフェノール抽出によって止め、クロロホルム抽出とエタノール沈殿の後、DNA断片をY-50緩衝液50μlに溶かし、20単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃、10分間の熱処理後、低融点アガロースゲル電気泳動法を用い、P_L-プロモーターおよびATG部分を含む0.97Kbの

部分を含むDNA断片を精製した。

この様にして得た約0.5μgのpTrS10由来のDNA断片と、約0.2μgのpPLD1由来のDNA断片を20μlのT4 DNAリガーゼ緩衝液中で2単位のT4リガーゼにより4℃で18時間結合反応を行った。このようにして得られた組換え体プラスミドを用いてE. coli MP347株を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換株を得た。

この形質転換株から、プラスミドを分離精製し、Sph I、C_{la}I、Pst Iなどの制限酵素で消化することにより、プラスミドの構造解析を行った結果、P_L-プロモーターの下流にATG部分を含む4.02KbのP_L-ATGベクターであることを確認し、pPA1と名付けた(第2図参照)。

(2) guaA遺伝子上流へのP_L-ATG配列の挿入

pPA1 DNA約5μgをY-50緩衝液50μlに溶かし、20単位のSph Iを加え、

DNA断片を精製した。

一方、特開昭60-192597号公報記載の、大腸菌のトリプトファン・プロモーターおよびGMPシンセターゼ遺伝子(guaA)を含むプラスミドpXAR33のDNA約5μgを50μlのY-100緩衝液に溶かし、20単位のHpa Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。このHpa I消化反応液30μlに5倍濃度のBa_l31緩衝液20μl、蒸留水46μl、および2単位のBa_l31を加え、30℃にて5分間消化反応を行った。フェノール:クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、DNA断片を30μlのY-50緩衝液に溶かし、15単位のPst Iを加え、37℃で2時間消化反応を行った。65℃10分間の熱処理後、低融点アガロースゲル電気泳動法により、guaAのN末端側が消化された約5.5KbのDNA断片を精製した。

この様にして得た約0.2μgのpPA1由来のDNA断片と、約0.5μgのpXAR33由

末のDNA断片を20μのT4 DNAリガーゼにより、4℃にて18時間結合反応を行った。得られた組換え体プラスミドDNAを用いて、*E. coli* MP347株を形質転換し、アンピシリン耐性の形質転換株を得た。

このアンピシリン耐性株をL培地で30℃にて4時間、さらに40℃にて3時間培養し、後述する方法でGMPシンセターゼ活性を調べ、pXAR33を保有している*E. coli* K294株と比較して高い活性を示す菌株を選択した。

高い活性を有する菌株(A-66株、今回寄託予定)からプラスミドを分離精製し、その構造解析を行った結果、A-66株の保有するプラスミドpPLA66はguaA遺伝子の上位にP_L-ATG配列が挿入された構造を有していた。

GMPシンセターゼ活性の測定は公知の方法(J. Biol. Chem., 226, 351-363 (1957))を下記のように若干変更して実施した。

組成の反応液中に共存せしめ、42℃にて振盪し、XMPからGMPへの転換反応を行った。

GMPの生成は、経時的に反応液を採取し、40倍容量の3.5%過塩素酸と混合し、遠心分離後上清の290nmの吸光度を測定することにより定量した。

第1表に本発明で使用もしくは取得した菌株のGMPシンセターゼ活性を示す。

活性は1分間に1μmolのGMPを生成する活性の量を1単位とした。

第 1 表

宿主菌株	プラスミド	寄託番号	湿潤菌体当り 活性 (単位/g湿潤菌体)
MP347		FERM BP-408	0.79
K294		FERM BP-526	0.88 ¹⁾
K294	pXAR33	FERM BP-500	73.5 ¹⁾
MP347	pPLA66	FERM BP-1200	327

1) 公開特許公報昭60-192597号公報参照

pPLA66を含む大腸菌菌株は、*Escherichia*

なお、活性測定に供する*E. coli*のうち、K294株およびK294/pXAR33株はその種培養(L培地にて30℃、一晚培養)をM9培地(NH₄Cl 1g/l、Na₂HPO₄ 6g/l、KH₂PO₄ 3g/l、NaCl 5g/l、MgSO₄·7H₂O 0.25g/l、グルコース3g/l、ビタミンB₁₂ 4g/l、カザミノ酸2g/lを含む)に接種し、30℃にて18時間振とう培養した。一方、MP347株およびMP347/pPLA66株は、種培養(L培地にて30℃、一晚培養)をL培地に1%接種し、30℃にて4時間、40℃にて3時間振とう培養した。これらの培養液を蒸留水により希釈し、これにトルエンを終濃度20ml/lとなるように添加し、37℃にて20分間振とうした。

このトルエン処理培養液を160mMトリス・塩酸(pH8.6)、12mM ATP、25mM XMP、16mM MgSO₄·7H₂O、40mM (NH₄)₂SO₄からなる

coli MP347/pPLA66 FERM BP-1200として工業技術院微生物工業技術研究所に昭和61年11月6日付で寄託してある。

実施例2.

実施例1で得たpPLA66保有株(PLA66)の培養液(湿潤菌体重量4.8mg/ml)を遠心分離により20倍に濃縮し、これにトルエンを終濃度で20ml/lとなるように添加し37℃にて20分間振盪した。次にXMP·Na₂·7H₂O 20mg/ml、ATP·Na₂·3H₂O 20mg/ml、および(NH₄)₂SO₄ 10mg/mlを含み、pHを8.6に調整した反応液30mlを200mlビーカーに入れ、これに上記トルエン添加菌体懸濁液0.2mlを添加した。この反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900rpm)し、苛性ソーダにてpHを8.6に調節しつつ、42℃に3時間保った。この反応の結果、反応液中に15.9mg/mlの5'-GMP·Na₂·7H₂Oが生成した。なお、PLA66株に代

えて、宿主であるMP347株を用いた場合の生成量は1 μ g/ml以下であった。

実施例3.

PLA66株を30mlのシ培地を含む300ml容三角フラスコに接種し、ロータリー・シェーカー(220rpm)にて、30℃で4時間、さらに40℃で3時間振盪培養を行った。該培養液にトルエン、XMP \cdot Na $_3$ \cdot 7H $_2$ O、ATP \cdot Na $_3$ \cdot 3H $_2$ O、(NH $_4$) $_2$ SO $_4$ をそれぞれ20 μ g/ml、20 μ g/ml、20 μ g/ml、10 μ g/mlとなるように添加した。温度を42℃に保ち、苛性ソーダにてpHを8.6に調節しつつ、さらに10時間振盪培養を続けた。その結果、培地中に17.7 μ g/mlのGMP \cdot Na $_3$ \cdot 7H $_2$ Oが生成蓄積した。なお、PLA66株の代わりに宿主であるMP347株を用いた場合の生成量は1 μ g/ml以下であった。

参考例1.

ATGベクター-pTrS10の造成:

第3図に示した手順に従い、370塩基対の

約0.5 μ gを得た。

上記で得たpTrS3由来のPstI-HpaI断片0.1 μ gとpKYP10由来のPstI-HpaI断片0.1 μ gをT4リガーゼ緩衝液20 μ lに溶かし、さらにT4DNAリガーゼ2単位を加え、4℃で18時間結合反応を行った。

得られた組換え体プラスミドの混合物を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、Ap^rのコロニーを得た。このコロニーの培養菌体からプラスミドDNAを調製し、制限酵素PstI、HpaI、BanIII、NsiI、SphIを用い構造解析を行った結果、目的のプラスミドpTrs10が得られたことを確認した。

発明の効果

本発明によればXMPを効率よくGMPに変換できる。

4.図面の簡単な説明

第1図はプラスミドpPLD1の造成工程を示す。

第2図はプラスミドpPLA66の造成工程

大きさのポータブル・P_{trp}断片を持ち、SD配列とATG開始コドンの間の距離が13塩基で、かつATGコドンの直後にSphIサイトを有するATGベクター-pTrS10を造成した。

まず、特開昭58-110600号公報記載の方法で調製したpTrS3 3 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶かし、制限酵素PstIとHpaIをそれぞれ6単位ずつ加え、37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法によりP_{trp}の一部とATG開始コドンを含む約3.1KbのDNA断片(PstI-HpaI断片)約2 μ gを得た。

一方、特開昭58-110600号公報記載の方法で調製したpKYP10 3 μ gをY-100緩衝液30 μ lに溶かし、制限酵素PstIとHpaIをそれぞれ6単位ずつ加え、37℃で3時間切断反応を行った。この反応液からLGT法により、P_{trp}の一部を含む約1.08KbのDNA断片(PstI-HpaI断片)

を示す。

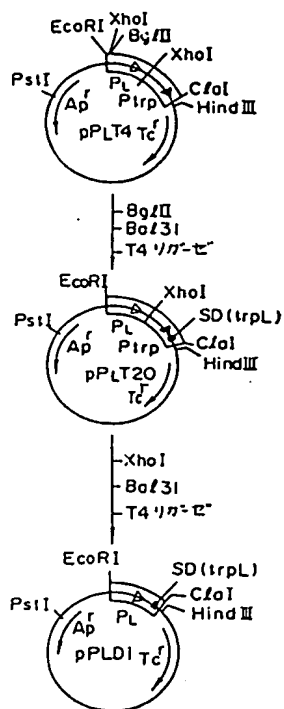
第3図はプラスミドpTrS10の造成工程を示す。

特許出願人(102)協和醗酵工業株式会社

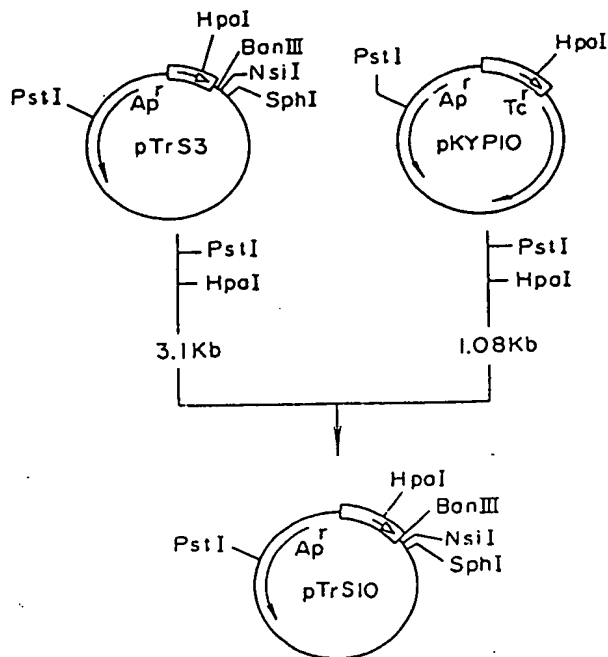
代表者 加藤幹夫



第1図



第3図



第2図

